

PCT/JP03/14271

Rec'd PCTO 04 OCT 2005

日本国特許庁 10/551999-03
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 4月16日

出願番号 Application Number: 特願 2003-112103

[ST. 10/C]: [JP 2003-112103]

出願人 Applicant(s): 井上 一知
株式会社クリエイティブ

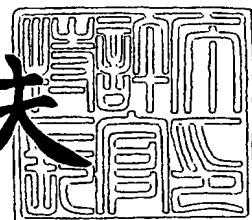


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特 2003-3103276

【書類名】 特許願
【整理番号】 I04J1008
【提出日】 平成15年 4月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 35/12
A61K 9/00
A61M 3/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖後院川原町 53 京都大学再生医
科学研究所内

【氏名】 井上 一知

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖後院川原町 53 京都大学再生医
科学研究所内

【氏名】 顧 元駿

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖後院川原町 53 京都大学再生医
科学研究所内

【氏名】 角 昭一郎

【特許出願人】

【識別番号】 502068285

【氏名又は名称】 井上 一知

【特許出願人】

【識別番号】 502385517

【氏名又は名称】 株式会社クリエイティブ

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞保存剤が配合されたポリビニルアルコール中に、細胞を含有する細胞製剤。

【請求項 2】 細胞表面が、更に細胞外マトリックスで覆われていることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞製剤。

【請求項 3】 更にグロースファクターを含有することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の細胞製剤。

【請求項 4】 細胞が、胰島細胞、胰内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞及び副甲状腺ホルモン分泌細胞から成る群から選択される1種又は2種以上の細胞であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 5】 細胞が、細胞保存剤で処理されていることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 6】 細胞が、形質転換体であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の細胞製剤、

【請求項 7】 シート状、板状、棒状、チューブ状又はビーズ状の形状を有することを特徴とする請求項 1～6 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 8】 細胞保存液が、E u r o - C o l l i n s 液、セルバンカー又はUW液であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 9】 哺乳動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に移植することを特徴とする請求項 1～8 に記載の細胞製剤。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法。

【請求項 11】 内分泌・代謝疾患が、糖尿病又は下垂体性小人症であることを特徴とする請求項 10 に記載の内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法。

【請求項 12】 請求項 1～9 のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする血友病の予防及び治療方法。

【請求項13】 請求項1～9のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする骨疾患の予防及び治療方法。

【請求項14】 請求項1～9のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする癌の予防及び治療方法。

【請求項15】 請求項1～9のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする肝不全又は先天性代謝異常の予防及び治療方法。

【請求項16】 ポリビニルアルコールに細胞保存剤を配合後、細胞を該ポリビニルアルコールに混合し、得られた細胞含有ポリビニルアルコールをゲル化することを特徴とする細胞製剤の製造方法。

【請求項17】 ヒト又は動物用の医薬である請求項1～9のいずれかに記載の細胞製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト又は動物用の医薬品組成物として有用な細胞製剤に関する。より詳しくは、生体にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を産生・分泌する細胞或いは有害な物質を解毒する作用を有する細胞を、安定かつ長期に保持する製剤であって、患者に投与することによって、内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療に効果を発揮する細胞製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

バイオ人工臓器とは、生細胞や生体組織等を含有し、患者に必要な代謝機能、具体的にはその代謝機能を司るホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子を患者に供給することによって、患者の疾病を予防又は治療することを目的とする装置である。免疫抑制剤による副作用やドナーの需要と供給等の問題を有する生体臓器移植と比べ、バイオ人工臓器は、免疫隔離膜によって細胞を生体の防御機構から保護できるため、免疫抑制剤を必要とせず、同種移植のみならず異種移植も可能であるという点で優れている。

【0003】

バイオ人工臓器は、その中に含有する細胞等の種類を変えることにより、あらゆる疾患の治療に対応できる。例えばバイオ人工胰島は、インスリン分泌細胞、例えば胰島細胞をその中に有し、胰島細胞から分泌されるインスリンホルモンを患者に供給して血糖値の是正を図るために用いられる。血液凝固因子生産型バイオ人工臓器は、その内部に血液凝固因子を生産する肝細胞を有しており、VIII因子やXI因子の不足により血液の凝固障害を有する血友病の治療に用いられている。また、成長ホルモン生産型バイオ人工臓器は、その内部に成長ホルモン（h G H）分泌細胞を有しており、成長ホルモンの分泌不足が原因で起こる下垂体小人症等の治療に用いられている。また、副甲状腺ホルモンおよびエリスロポエチンをそれぞれ分泌する細胞をバイオ人工臓器に含有させることにより、上皮小体機能低下症及び貧血のような他の疾病も治療することができる。

【0004】

バイオ人工臓器には様々な形状がある。その例として、細胞を高分子重合体で包み込んだマイクロカプセル型又はマクロカプセル型等が挙げられる。これらは、高分子重合体が有する強固な架橋構造によって、その中に含有される細胞を生体の防御機構から護り、更に高分子重合体が有する分子透過能を利用して、細胞から分泌されるホルモン等を生体に供給することを特徴としている。

マクロカプセル型人工臓器等に用いられる高分子重合体として、近年、ポリビニルアルコール（以降PVAと略す）が着目されている。PVAは、従来より食品業界や医療業界において用いられ、具体的には手術用縫合糸や食品と接触する容器等に応用してきた。また、PVAを人工関節軟骨材料として用いる技術（例えば非特許文献1参照）がこれまでに開示されており、臨床面での安全性についても評価されている（例えば非特許文献2参照）。

【0005】

PVAは、化学的又は物理的処理を施すことによりゲル化し、あらゆる形状に成形が可能である。化学的処理としては、PVAを含む水溶液にグルタルアルデヒド（架橋剤）及び塩酸（触媒）を添加する方法（例えば非特許文献3参照）、又はPVAを含む水溶液をガラスプレート等に塗布し、これをNa₂SO₄/KOH水溶液に浸漬する方法（例えば非特許文献4参照）等が、また物理的処理とし

では、PVAを含む水溶液を約-80℃で急冷しゲル化する方法等が通常用いられる。しかしながら、PVAをマクロカプセル型人工臓器等の高分子重合体として用いる場合には、これらの化学的又は物理的処理の必要性が問題となる。

【0006】

具体的には、PVAを化学的処理によりゲル化して袋状のPVAゲル膜を作製し、その袋内に細胞を入れてバイオ人工臓器を作製するという方法がある。しかしながらこの方法では、袋のシーリング処理やPVAゲル膜に残存した架橋剤等により細胞がダメージを受けたり、袋内の細胞が凝集することにより細胞が壊死する等、生存細胞数の減少又は生物活性の低下によるホルモン分泌量の低下が否めない。

物理的処理は薬剤を使用することなく、またPVAゲル中に細胞を分散させて包含することができるため、凝集等による細胞の壊死の危惧がない点で好ましいが、-80℃で急冷する際に細胞が破壊される恐れがある。

【0007】

バイオ人工臓器内に含有された細胞は、患者に必要な代謝機能を発揮する生物学的活性因子を安定に供給できる状態にあることが望ましい。従ってPVAは、その特性からマクロカプセル型バイオ人工臓器等に適した高分子重合体ではあるものの、その応用技術は未確立であった。よって本発明の如く、PVAが有する特性を利用し、かつPVAゲル内で細胞を安定に保持できるバイオ人工臓器はこれまでに全く知られていない。

【0008】

【非特許文献1】

小林ら (Kobayashi M., et al.) 、ポリビニルアルコールハイドロゲル製人工関節軟骨の予備研究 (Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus) 、バイオマテリアルズ (Biomaterials) 、2003年、第24巻、p639-647

【非特許文献2】

C.C.デメリスら (C.C.Demerlis et.al) 、ポリビニルアルコールの口腔内毒性に関する調査 (Review of the oral toxicity of PVA) 、フードアンドケミカル

ルトキシコロジー (Food and Chemical Toxicology) 、2003年、第41巻、p319-3

26

【非特許文献3】

クリスティーナBら (Krystyna Burczak et. al) 、マイクロカプセル型PVAハイドロゲル人工臍の生体内長期安定性と生物学的互換性 (Long-term in vivo performance and biocompatibility of PVA hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas) 、バイオマテリアルズ (Biomaterials) 、1996年、第17巻、p2351-2356

【非特許文献4】

タイーホーン ヤンら (Tai-Horn Young et. al) 生体内PVA人工臍の評価とモデリング (Assessment and modeling of PVA bioartificial pancreas in vivo) 、バイオマテリアルズ (Biomaterials) 、2002年、第23巻、p3495-3501

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト又は動物用の医薬品組成物として有用な細胞製剤を提供することを目的とする。より詳しくは、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、バイオ人工臍器に用いられる高分子重合体として適切な材料であるPVA中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤及び該細胞製剤の製造方法を提供することを目的とする。更には、該細胞製剤を患者に投与するにより、内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意検討を重ねた結果、予めPVAを細胞保存剤、例えばEuro-Collins液、セルバンカー又はUW液等で処理した後に細胞と混合してゲル化させることによって、PVAゲル中の細胞の死滅率やダメージを低減することができ、PVA中で細胞が安定に保持されることを見出した。より具体的には、粉体のPVAを液状細胞保存剤で溶解してPVA-細胞保存剤混合液を作製後、その混合液中に細胞を分散させて急冷し、PVAをゲル化さ

ることにより、PVA中の細胞の生存率及び生物学的活性因子分泌機能の低下が抑制されること、更には、安定に長期間患者にホルモン又はタンパク質等を供給することができる細胞製剤が得られることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて更に検討を重ね、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は

- (1) 細胞保存剤が配合されたポリビニルアルコール中に、細胞を含有する細胞製剤、
- (2) 細胞表面が、更に細胞外マトリックスで覆われていることを特徴とする前記(1)に記載の細胞製剤、
- (3) 更にグロースファクターを含有することを特徴とする前記(1)又は(2)に記載の細胞製剤、
- (4) 細胞が、膵島細胞、膵内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞及び副甲状腺ホルモン分泌細胞から成る群から選択される1種又は2種以上の細胞であることを特徴とする前記(1)～(3)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (5) 細胞が、細胞保存剤で処理されていることを特徴とする前記(1)～(4)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (6) 細胞が、形質転換体であることを特徴とする前記(1)～(5)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (7) シート状、板状、棒状、チューブ状又はビーズ状の形状を有することを特徴とする前記(1)～(6)のいずれかに記載の細胞製剤、

【0012】

- (8) 細胞保存液が、Euro-Collins液、セルバンカー又はUW液であることを特徴とする前記(1)～(7)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (9) 哺乳動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に移植することを特徴とする前記(1)～(8)に記載の細胞製剤、
- (10) 前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法、

- (11) 内分泌・代謝疾患が、糖尿病又は下垂体性小人症であることを特徴とする前記(10)に記載の内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法、
- (12) 前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする血友病の予防及び治療方法、
- (13) 前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする骨疾患の予防及び治療方法、
- (14) 前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする癌の予防及び治療方法、
- (15) 前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする肝不全又は先天性代謝異常の予防及び治療方法、
- (16) ポリビニルアルコールに細胞保存剤を配合後、細胞を該ポリビニルアルコールに混合し、得られた細胞含有ポリビニルアルコールをゲル化することを特徴とする細胞製剤の製造方法、
- (17) ヒト又は動物用の医薬である前記(1)～(9)のいずれかに記載の細胞製剤、
に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明は、細胞保存剤を配合したPVAを含有し、そのPVA中に患者にとって有用なホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子を産生・分泌する細胞を有していることを特徴とする。

本発明で用いられるPVAは、本発明の目的を阻害しない限りどのようなものでもよいが、例えば目薬の角質保護・保湿剤、腸管癒着防止膜等の医用材料や、食品包装フィルム等の食品接触材料として用いられる程度の純度を有するものであることが好ましい。また市販物あっても、酢酸ビニルからポリ酢酸ビニルを作り、これを加水分解することにより得られる製造物の凍結乾燥品であってもよい。またPVAを製造する場合、その製造方法並びに凍結乾燥方法は、それ自体公知の技術に従ってよい。PVAの平均重合分子量は、約5,000～16,600程度で、ケン化度は約85%以上のものが好ましい。

これらのPVAは、細かい粒子状の凍結乾燥品で、生理食塩水やリン酸バッファー等の溶液に容易に懸濁できる形状であることが望ましい。

【0014】

細胞保存剤が配合されたPVAとは、PVA中に細胞保存剤を含有するPVAを意味する。本発明で用いられる細胞保存剤は、特に限定されないが、通常動物細胞等の保存に用いられる液剤であって、例えばEuro-Collins液又はセルバンカー（SERUBANNKA code 630-01601: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan）やUW液（ビアスパンViaSpan: Bristol-Myers Squibb Company, USA）等の市販の保存液であってよい。これらは市販のものであっても、実験室内で調製された組成物であってもよい。実験室で調製する場合は、蒸留水等に各組成成分を添加・混合し、フィルターろ過等することにより除菌して調製することが好ましい。例えば、Euro-Collins液の組成は、表1の通りである。

【0015】

【表1】

成分	g/L
D-Glucose	35.0
K ₂ HPO ₄	7.4
KH ₂ PO ₄	2.05
KCl	1.12
NaHCO ₃	0.84
Nicotinamide	1.22

【0016】

PVA中に細胞保存剤を含有するPVAは、例えばPVAと細胞保存剤とを混合して作製することができる。また得られる細胞保存剤が配合されたPVAは、無菌的であることが望ましい。PVAと細胞保存剤とを混合する方法は特に限定されないが、例えば、市販の粒子状PVAを蒸留水等に懸濁し、該PVA懸濁液を加熱滅菌（オートクレーブ等）することにより溶解・殺菌処理し、得られた無菌PVA水溶液に無菌的に細胞保存剤を添加・混合する方法等が挙げられる。加熱滅菌処理や、無菌操作は、それ自体公知の手段に従ってよい。

ここで、上記の混合手段及びそれ以外の何らかの手段を用いて作製された細胞

保存剤を含有するPVAを、細胞保存剤で処理されたPVAと称することとすると、この細胞保存剤で処理されたPVAも本発明の範囲内であることは言うまでもない。

【0017】

またPVA懸濁水溶液と細胞保存剤とを混合して得られる混合液（以降、PVA—細胞保存剤溶液と称する）中のPVAの含有量は、PVA—細胞保存剤溶液に対して、通常約2～5重量%、より好ましくは約2.5～3.5重量%、特に好ましくは約2.5～3重量%である。これは、該濃度域においてPVAが最もゲル化し易く、かつ本発明の細胞製剤の細胞を包含するのに好ましい強度のPVAゲルが得られるからである。またPVA—細胞保存剤溶液中の細胞保存剤の濃度は、通常の細胞保存に用いる細胞保存剤の濃度を1倍とすると、通常約0.8～1倍、より好ましくは約0.9～1倍、特に好ましくは約0.95～1倍である。これは、該濃度域の範囲を外れると、細胞が安定に生存できない場合があるからである。従って、本発明においては、通常の細胞保存に用いる濃度の約2～10倍である濃縮細胞保存液を調整又は購入し、これと上記PVA懸濁水溶液とを適宜（例えば、10倍濃縮細胞保存液：PVA懸濁水溶液=1:9）混合して、約1倍濃度の細胞保存剤を含有するPVA—細胞保存剤溶液を作製するのが好ましい。

【0018】

本発明の細胞製剤には、更に、細胞の保護を目的としてジメチルスルフォキシド（DMSO）や血清アルブミン等が、雑菌の混入を阻止する目的で抗生物質等が、また細胞の活性維持のためにニコチンアミド等のビタミン類等が含まれてもよい。更に本発明は、通常製剤に添加されることが薬事法上許容されている他の添加成分、例えば徐放性付与剤、等張化剤、pH調整剤等が補填されていてもよい。これら他の添加成分の、細胞製剤への添加方法は特に限定されないが、上記PVA—細胞保存剤溶液を作製する際に、該溶液中に無菌的に混合されるのが好ましい。これらの含有量は、本発明に含まれる細胞の増殖・生存及び／又は生物学的活性因子の分泌等を阻害しない範囲であって、本発明の目的を損なわない範囲であることが好ましい。

細胞保存剤で処理されたPVAは、上述した様に無菌的に製造されることから、本発明の細胞製剤は雑菌等による汚染の確率が低く、室温（約15～35℃）で長期間保存が可能である。

【0019】

本発明に用いられる細胞として、胰島細胞、胰内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞又は副甲状腺ホルモン分泌細胞等を挙げることができる。これらの細胞は、ヒト、ブタ、ラット又はマウス等の哺乳動物由来であって、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を産生・分泌する細胞であることが好ましい。細胞の種類の選択は、投与される患者の疾患の種類によって決定されるのが好ましい。例えば、糖尿病患者等にはインスリンを産生する胰島細胞又は胰内分泌細胞等を、血友病患者等には血管凝固因子等を産生する肝細胞等を、下垂体性小人症等の患者には成長ホルモンを産生する前葉細胞や成長ホルモン分泌細胞等を、また骨折等の骨疾患者には骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Protein：BMP）を産生する骨細胞等を用いるのがよい。癌患者等には、遺伝子組換えにより腫瘍成長抑制物質を大量に産生しうる形質転換細胞等を用いることもできる。また肝不全、腎不全又は先天性代謝異常等により体内に有毒な代謝産物が蓄積する疾患の患者に対しては、有毒な代謝産物を選択的に代謝・解毒する作用を有する細胞を用いることもできる。患者が複数の疾患を有する等、複数の生物学的活性因子を必要とする場合には、上記細胞を2種以上組み合わせてもよい。本発明はこれらの細胞を含有することにより、上記患者等に有用な生物学的活性因子を供給することができる。従って、本発明の細胞製剤を用いることにより、生物学的活性因子を供給することや有害な代謝産物を解毒することにより治療が可能な様々な疾患の発症を予防したり、治療することができる。

【0020】

本発明に用いられる上記の細胞は、実験室用に確立された細胞又は生体の組織から分離した細胞等のいずれであってもよいが、分化した非分裂細胞であることが好ましい。何故なら未分化な分裂細胞よりも、分化した非分裂細胞の方が、より目的とするホルモンやタンパク質等を産生・分泌しうるからである。

生体組織からの細胞の分離方法は特に限定されず、公知の技術に従ってよい。例えば、適切な手段で摘出した組織を、D i s p a s e 又はE D T A 等で処理し、ついでトリプシン処理して単一の細胞まで分離する方法等が挙げられる。

【0021】

例えば本発明に用いられる細胞が膵島細胞である場合、この細胞の生体組織からの分離は、公知のコラゲナーゼ処理による分離方法、例えば J. Adam Van Der Vliet et al., Transplantation, 45(2), p493-495 (1988) 等に従ってよい。

本発明に用いられる細胞が膵内分泌細胞である場合、例えば特開2001-231548号公報に記載の方法等に従ってよい。

上記のように生体組織から分離された細胞は、病原性ウイルス等の病原体が除去されていることが望ましい。

【0022】

実験室用に既に確立された細胞又は生体組織から得られた単一細胞は、適切な培地でコンフルエントになるまで培養され、継代培養を2~3回繰り返してから、本発明の細胞として用いられるのが好ましい。例えば本発明に用いる細胞が、膵島細胞又は膵内分泌細胞（以降膵内分泌細胞等と略す）である場合は、これらの細胞を、例えば10%ウシ胎児血清（以降、F B Sと略す）及びニコチニアミドを補填したC M R L - 1 0 6 6 培地（Sigma, St. Louis, MO, USA）で継代培養するのが好ましい。継代培養された細胞は、トリプシン処理及びコラゲナーゼ処理等の公知の手段に従って、再度単一細胞として分離され、本発明の細胞として用いることができる。

【0023】

また本発明に用いられる細胞は、投与される患者に必要なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子が導入された形質転換細胞であってもよい。該形質転換細胞を用いることにより、目的とする生物学的活性因子ペプチドを効率的かつ大量に産生することができる。生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子としては、既にその塩基配列が公開されており、アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection : A T C C）等の寄託機関や一般の市販源から容易に入手が可能な遺伝子、又は既知

の塩基配列からオリゴヌクレオチドプローブを作製し、該プローブを用いて、例えばPCR增幅法、DNA合成法の公知の手段を用いて合成される遺伝子等が挙げられる。例えば、腫瘍成長抑制タンパク質をコードする遺伝子を有する形質転換細胞を用いることにより、本発明の細胞製剤を癌の予防及び治療剤として使用することができる。

【0024】

上記の生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子が導入される宿主細胞は特に限定されず、通常遺伝子組換え技術分野において用いられる公知の宿主細胞を使用してよい。例えば宿主細胞としては、上記の胰島細胞、胰内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞等の他に、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO細胞と略記）、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO(dhf⁻)細胞と略記）、マウス細胞BALB/3T3、マウスL細胞、マウスA_tT-20、マウスC127細胞、マウスマミエローマ細胞、ラットGH3、ヒト細胞HeLa、ヒトFL細胞等が挙げられる。

【0025】

本発明で用いられる細胞への上記の遺伝子の導入方法は、特に限定されず公知の手段に従ってよい。例えば、プラスミドやウイルス等の組換え発現ベクター又はリポソーム、マイクロカプセル等の人工ベクターに含有させて細胞に導入する等の公知の方法が挙げられる。組換え発現ベクターを用いる場合には、コンピント細胞法[J. Mol. Biol., 53, p154 (1970)]、DEAEデキストラン法[Science, 215, p166 (1982)]、インビトロパッケージング法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, p581 (1975)]、ウイルスペクター法[Cell, 37, p1053 (1984)]、マイクロインジェクション法[Exp. Cell. Res., 153, p347 (1984)]、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, p133 (1990)]、リン酸カルシウム法[Science, 221, p551(1983)]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, p7413 (1987)]、プロトプラスト法[特開昭63-2483942号公報、Gene, 17, p107, (1982)、Molecular & General Genetics, 168, p 111 (1979)]に記載の方法等を挙げることができる。

【0026】

また、その遺伝子を宿主細胞に導入するためのベクター等も特に限定されず導入された細胞内で所望の遺伝子を発現させ、生物学的活性因子ペプチドを有効に产生する事ができる発現ベクターであればよい。例えば、 λ ファージ等のバクテリオファージ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等が挙げられる。

【0027】

本発明に用いられる細胞は、以下の手法によりPVA中に包含されるのが好ましい。

上記で作製したPVA—細胞保存剤溶液中に、細胞を添加・混合する。添加・混合される細胞は、予め細胞保存剤で処理されていることが好ましい。具体的には、細胞を細胞保存剤中に予め懸濁し、遠心により細胞を回収した後、PVA—細胞保存剤溶液と混合するのが好ましい。本発明の細胞製剤中に含有される細胞の数は、該細胞製剤を投与される患者の疾患の種類及び疾患の程度等によって異なるため一概には言えず、医師の判断によって決定されるのが好ましいが、例えばPVA—細胞保存剤溶液中、好ましくは約 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ cells/m1である。細胞数をこの範囲に設定することにより、細胞がPVAゲル内で均等に分散され、細胞凝集等による細胞への酸素及び栄養分の供給が阻害されることなく、細胞が長期間安定に生存することができる。

【0028】

また本発明に用いられる細胞が、その生物学的活性因子を最適に供給できる状態で安定に保持されるために、本発明の細胞製剤は、更にヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン酸等のムコ多糖、エラスチン、コラーゲン及びフィブリリン等から選ばれる1種以上を含む細胞外マトリックス、及び／又は肝細胞増殖因子（HGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、ヒト塩基性線維芽細胞増

殖因子（bFGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、インスリン様成長因子（IGF）又は成長ホルモン（GH）等のグロースファクター等を含有していてもよい。これらのグロースファクターは、1種又は2種以上含有されていてもよい。細胞外マトリックス及び／又はグロースファクター等を本発明に含有させる方法としては、例えば、上記PVA—細胞保存剤溶液と細胞とを混合する前に、細胞外マトリックス及びグロースファクターを含有する細胞培養培地等に細胞を浸漬し、細胞表面に細胞外マトリックス等の膜を形成させるか、或いはPVA—細胞保存剤溶液に予め細胞外マトリックス及び／又はグロースファクターを含有させる方法等が挙げられる。本発明の細胞製剤における上記細胞外マトリックス及び／又はグロースファクター等の含有量は特に限定されないが、本発明に用いられる細胞の保持、生物学的活性因子の分泌機能を阻害しない範囲であって、細胞の生存期間及び生物学的活性因子の分泌期間を延長する効果を付加しうる範囲であることが望ましい。

【0029】

PVA—細胞保存剤溶液と細胞とを混合後、得られた細胞混合液（以降、細胞含有PVA—細胞保存剤溶液と称す）を冷却し、PVAをゲル化することにより本発明の細胞製剤を作製することができる。冷却は、例えば約-20～-80℃の超低温庫等で約半日～3日間静置したり、約-80℃の超低温庫に約18～30時間保存することにより行うのがよい。

本発明は、PVAに予め細胞保存剤が配合されているため、上記温度で急冷しても、細胞の死滅やダメージを抑制することができる。しかもPVAゲル中に細胞を分散して含有することができ、細胞の凝集等を防止することができる。

PVAがゲル化することにより、本発明は様々な形状、例えばシート状、板状、盤状、棒状、チューブ状又はビーズ状等に形成され得る。例えば、上記細胞含有PVA—細胞保存剤溶液をガラスプレート上に塗抹し、このガラスプレートごと冷却することにより、薄膜シート状の細胞製剤を作製することができる。ガラスプレート単位面積当たりの細胞含有PVA—細胞保存剤溶液塗抹量を適宜変化させることにより、所望の厚みを有する細胞製剤を作製することができるが、通常は、約100～300μ1/mm²である。

【0030】

本発明の細胞製剤は、その補強又は／及び操作性の簡便化のために、補強材と組み合わせて用いてもよい。例えば、細胞製剤を薄膜シート状にする場合には、その補強及び操作性の簡便化のために、上記細胞含有PVA—細胞保存剤溶液を樹脂製メッシュシート等に固定してゲル化するのがよい。具体的には、図1において、例えばPET(ポリエチレンテフタレート)樹脂製メッシュシート(4)をガラスプレート(5)上に設置し、このメッシュシート①上に細胞含有PVA—細胞保存剤溶液を塗布する。別のメッシュシート(6)を上から被せ、更にその上から別のガラスプレート(7)を被せ、細胞含有PVA—細胞保存剤溶液とメッシュシート①及び③を、ガラスプレート(5)及び(7)とで挟む。そのまま約-20～-80℃で冷却することによりシート状ゲルに成形することができる。また上記メッシュシートは、予めPVA—細胞保存剤溶液に浸漬しておくことが好ましい。

【0031】

上記の補強材、例えばメッシュシートは、生体にとって安全な素材、つまり生体内において非分解性であって生体適合性に優れた素材、例えばPET等であることが好ましい。これは、生体内において本発明の細胞製剤中のメッシュシートが分解すると、該細胞製剤が生体組織に癒着し、本発明の効果を長期に奏する事が困難となるばかりでなく、生体にとっても有害となりうる場合があるからである。もちろん、生体内で分解しても生体に有害でない補強材も、本発明に使用されうることは言うまでもない。

【0032】

冷凍状態の細胞製剤は、冷凍状態にある細胞を活性化した後に生体に投与されるのが好ましい。冷凍細胞製剤中の細胞の活性化は、細胞を解凍し、適切な培地で再培養することにより行うことができる。具体的には、約37℃の細胞培養培地、例えばCMRL-1966等に冷凍状態の細胞製剤をすばやく浸漬して解凍した後、更に新たな細胞培養培地で、例えば約24時間培養することによって行う。該細胞製剤にDMSOが含まれる場合には、解凍された細胞製剤を新たな細胞保存液、例えばUW液等を用いて洗浄した後、更にUW液中で、例えば約4℃

、約24時間浸漬することによって、ゲル中のDMSOを除去するのが好ましい。言うまでもないが、上記のように解凍され、DMSOが除去された細胞製剤も本発明の細胞製剤である。

【0033】

上記の方法により得られる細胞製剤の生体への投与形態は、投与される患者の疾患の種類、疾患部位、疾患の程度によって異なるため一概に言えず、医師の判断によって決定されるが、好ましい投与形態を以下に述べる。

本発明の細胞製剤を投与する対象は、ヒトをはじめ、イヌ、ネコ、サル、ウサギ及びマウス等のヒト以外の哺乳動物である。

本発明は、上述した通り、生体内の投与部位に適した形状に成形されて投与することができる。また本発明は、疾患を有する組織に直接接触する状態で投与部位に移植されてもよいが、比較的軽微な侵襲で投与できる皮下又は筋肉内に移植することもできる。例えば、チューブ状の該細胞製剤を細断し、移植針等を用いて皮下に移植したり、注射器等に該細胞製剤を充填し、筋肉内や皮下に注入することもできる。しかも該部位からの細胞製剤の回収も容易である。皮下や筋肉内等に該細胞製剤を移植する際、移植部位の血管分布密度が疎であり、細胞が増殖・生存するための酸素及び栄養分の供給が困難と考えられる場合には、公知の適切な血管新生誘導剤等を複合させて移植することもできる。血管新生誘導剤は、細胞製剤中に予め含有させておいてもよいし、細胞製剤とは別の形態で投与されてもよい。

【0034】

本発明の細胞製剤から患者に供給されるホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子の量は、用いられる細胞の生物学的活性因子の分泌能及び移植期間中の細胞生存率の推移等を考慮して、医師の判断により適宜設定することができる。例えば、患者の疾患が糖尿病である場合、用いられる細胞、例えば膵内分泌細胞等のインスリン分泌能をin vitroにて予め測定しておき、そのインスリン分泌能、細胞数、投与期間及び細胞の生存率の推移等から、本発明の細胞製剤のインスリン供給量を決定することができる。本発明の細胞製剤は、含有する細胞を安定に長期間保持できることから、時間経過に伴う生物学的活性因子の分泌能の低下率

が低い。従って本発明を用いれば、患者に必要とされる生物学的活性因子を長期間安定して患者に供給することができ、細胞製剤の移植の頻度も少なくすることができる。

【0035】

本発明の細胞製剤に用いられる細胞の生物学的活性因子の分泌能は、それぞれの生物学的活性因子の測定に適した公知の定量方法に従ってよい。例えば、細胞が膵内分泌細胞等である場合のインスリンの定量方法については、以下の実施例で詳細に説明する。

【0036】

【実施例】

以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、言うまでもなく、本発明はこれらに限定されるものではない。尚、「%」は、いずれも「質量%」を表す。

【0037】

(製造例) 膵島細胞を含有するシート状細胞製剤の製造

(1) 膵島細胞の調製

8～10週令、体重300～350gのWisterラット(Shimazu animal Co. Ltd. Kyoto, Japan)から、以下の方法により膵島細胞を分離した。

まず摘出したラット膵臓の膵管内に、I型コラゲナーゼ(Sigma, St. Louis, MO, USA, 350U/mg)及びXI型コラゲナーゼ(Sigma, St. Louis, MO, USA, 2,200U/mg)をそれぞれ800U/ml及び1500U/mlの濃度で含有するハンクス液10mlを注入し、37℃、15～20分間の酵素処理を施した。冷却ハンクス液を添加し、酵素反応を停止した。ピペットを用いて膵臓組織を分散し、遠心により組織ペレットを回収した後、ハンクス液で組織ペレットを2回洗浄した。尚、遠心は1,000rpm、1分間とした。組織懸濁液を800μmサイズのメッシュシートを用いてろ過した。ろ過液を50mlコニカルチューブに回収し、遠心(1500rpm、3分間)して組織ペレットを得た。該ペレットを27%デキストラン(Sigma, St. Louis, MO, USA, MW 70,000)を含むハンクス液に懸濁し、不連続密度勾配遠心処理した。この時、最下層を27%デキストラン

(密度1.094g/ml)、上層を23%デキストラン(密度1.081g/ml)及び11% (密度1.041g/ml) デキストランの2層とした。不連続密度勾配遠心は、400 rpmで4分間、更に1,700 rpmで10分間行った。遠心後、最上2層の界面より膵島細胞含有画分をパストールピペットを用いて採取した。得られた膵島細胞をCMRL-1066培地を用いて2回洗浄した(1,000 rpm、3分間)。

【0038】

(2) PVA-Euro-collins溶液の作製

PVA 3 g (ゲンセー社製:PVA-180H, Lot37435) を75mlの蒸留水に懸濁後、オートクレーブ(121℃、15分)による加熱溶解滅菌処理を2回施した。得られた無菌PVA水溶液に、10倍濃度Euro-collins溶液(以降、EC溶液と略す) 10ml、DMSO 5ml、FBS 10ml及び0.122gニコチニアミドを無菌的に混合・攪拌し、無菌3%PVA-EC溶液100mlを得た。上記10倍濃度EC溶液は、蒸留水100mlに、表1に示す成分を添加・混合した後、0.22μmのろ過除菌を行い作製した。作製後は室温で保存した。

【0039】

(3) 細胞の混合

(1) 得られた膵島細胞を、更に10%FBS及び1.22g/Lニコチニアミドを含むCMRL-1066培地を用いて、炭酸ガスインキュベーター(5%CO₂、37℃)で24時間培養した。1,000個の膵島細胞を含む培養液を1.5ml容遠心チューブ内に入れ、800 rpmで1分間遠心した。得られた細胞ペレットにセルバンカー(SERUBANNKA code 630-01601: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan) 0.1mlを添加し、細胞を懸濁した後5分間放置した。再度遠心して細胞を回収した。回収した細胞を、(2)で作製した無菌3%PVA-EC溶液100μl中に懸濁し、膵島細胞含有PVA-EC溶液を得た。

【0040】

(4) シートの形成

10mm×10mm角のPET製メッシュシート(ゲンセー社製:TNO 60

S S) 2枚を予め無菌3%PVA水溶液に5分間浸漬し、この内の一枚①をガラスプレート②上に設置した。上記(3)で得られた臍島細胞含有PVA-EC溶液を上記メッシュシート①上に均一に塗布し、もう一枚のメッシュシート③を上から被せ、メッシュシート①-臍島細胞含有PVA-EC溶液-メッシュシート③の3層構成シートとした。更に上から別のガラスプレート④を被せ、圧力を加えて約1mm厚の3層構成シートとなるよう調整し、これを2枚のガラスプレートで挟んだ状態のままで-80℃、24時間保存してPVAをゲル化した(図1)。

【0041】

(5) シート状臍島細胞製剤の解凍及び細胞の活性化

上記(4)で得られた凍結シート状臍島細胞製剤を、37℃のCMRL-1066培地中で速やかに解凍した。解凍されたシート状臍島細胞製剤を、5mlのUW液(ビアスパンViaSpan: Bristol-Myers Squibb Company, USA)中に5分間浸漬した。この操作を3回繰り返し、該シート内に含有されるDMSOを除去した。該シートを更に5mlのUW液中で、4℃、24時間浸漬した。浸漬後の該製剤をCMRL-1066培地で2回洗浄後、更にCMRL-1066培地中で24時間(37℃、5%CO₂)培養し、細胞が活性化されたシート状臍島細胞製剤(製造例1)を得た。得られた製造例1を、以降の試験例に用いた。尚、上記(2)で10倍濃度EC溶液10ml、DMSO5ml、FBS10ml及び0.122gニコチンアミドを添加しない無菌3%PVA水溶液を作製し、これを用いて製造したシート状臍島細胞製剤を比較例1とした。

【0042】

(試験例1) 製剤中の細胞の安定性確認

上記製造例1、比較例1又は遊離の臍島細胞(200個)を、CMRL-1066培地中で培養した(5%CO₂、37℃)。培養1日後の製造例1又は比較例1内の生細胞数及び遊離の臍島細胞数をそれぞれ顕微鏡下にてカウントし、生細胞の回収率(%)を求めた。回収率は培養前の細胞数を100として表した。

図2に結果を示す。製造例1の生細胞の回収率は約82%と、比較例1の回収率(約35%)に比べて非常に高く、その値は遊離細胞の場合よりも高値であつ

た。

【0043】

(試験例2) 製剤中のインスリン含有量の確認

上記製造例1、比較例1又は遊離の胰島細胞(200個)をCMRL-1066培地中で培養し(5%CO₂、37℃)、培養1日後のそれぞれのインスリン含有量を調べた。培養1日後の製造例1、比較例1又は遊離の胰島細胞を塩酸-EtOHに回収し、スパートル等を用いてそれぞれすり潰し、次いでボルテックスで製剤中のゲル及び細胞を塩酸-EtOH中に攪拌・懸濁した(-20℃、24時間)。それぞれの細胞懸濁液中のインスリン濃度を測定した。インスリンは、市販インスリン測定ELISAキット(レビスインスリンキット(シバヤギ))を用いて測定した。

結果を図3に示す。製造例1中のインスリン含有量(約205ng/ml)は、比較例1(約20ng/ml)に比べて著しく高値を示し、その値は遊離細胞とほぼ同程度であった。

【0044】

(試験例3) 製剤のインスリン分泌能及び細胞の状態確認

上記製造例1、比較例1又は遊離の胰島細胞(200個)をCMRL-1066培地中で培養し(5%CO₂、37℃)、培養1日後、7日後、14日後に、それぞれを回収した。回収後、それぞれについてグルコース反応試験を行った。グルコース反応試験は以下の通りである。まず、上記の回収した製造例1、比較例1又は遊離の胰島細胞を3.3mMのグルコース及び0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むCMRL-1066培地中で1時間培養(5%CO₂、37℃)後、グルコースを含まないCMRL-1066培地で洗浄した。再度この操作を繰り返し、更に3.3mMのグルコースを含むCMRL-1066培地中で1時間培養した後、それぞれの上清中のインスリン濃度を測定した。次いで16.7mMのグルコースを含むCMRL-1066培地で1時間培養し、それぞれ上清中のインスリン濃度を測定した。

【0045】

結果を図4に示す。図4中(a)は培養1日後、(b)は培養7日後、(c)

は培養14日後のインスリン分泌量（濃度）をそれぞれ示す。比較例1では、グルコース濃度の上昇に依存したインスリン分泌量の上昇は見られなかった。これに対し、製造例1は培養1日後、7日後、14日後ともに、グルコース濃度の上昇に依存してインスリン分泌量（濃度）が上昇した。しかも遊離細胞では、既に7日後にグルコース濃度に依存したインスリン分泌量の上昇が見られなくなったのに対し、製造例1では14日後においてもその上昇が認められた。

また、製造例1又は比較例1中に含有される細胞を顕微鏡観察した結果、比較例1中の細胞は1日目から既に細胞破壊が生じていた。これに対し製造例1中の細胞は顕著な細胞破壊が認められず、14日後も比較的安定に生存していた（図5）。図5中、（a）は培養1日後、（b）は培養7日後、（c）は培養14日の細胞観察像をそれぞれ示す。

【0046】

以上の結果より、製造例1中において胰島細胞は安定に生存し、長期間安定にその活性を維持し、グルコース濃度の上昇に反応してインスリンを分泌することが分かった。従って、PVAに予めEC溶液を配合することにより、PVAゲル化の際の急冷による細胞の死滅及び細胞へのダメージが抑制され、その結果、PVA中に含有される胰島細胞の生存率が高く、かつインスリン産生能及びグルコース濃度の上昇に対する反応性を維持できる細胞製剤が製造できることが証明された。

【0047】

【発明の効果】

本発明により、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、バイオ人工臓器に用いられる高分子重合体として適切な材料であるPVA中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤を提供することができる。更には、本発明を患者に投与するにより、内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防及び治療を行うことができる。本発明は、細胞を安定な状態で長期間有することができるため、その移植の頻度を低減することができ、しかも様々な形状に形成できるため、注射等による皮下や筋肉内への移植も可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 シート状臍島細胞製剤の製造方法を示す模式図である。

【図2】 製造例1、比較例1又は遊離臍島細胞の培養1日後の生細胞の回収率を調べた結果を示す図である。

【図3】 製造例1、比較例1又は遊離臍島細胞中の培養1日後のインスリン含有量を調べた結果を示す図である。

【図4】 製造例1、比較例1又は遊離臍島細胞のインスリン分泌能を経時的に調べた結果を示す図である。

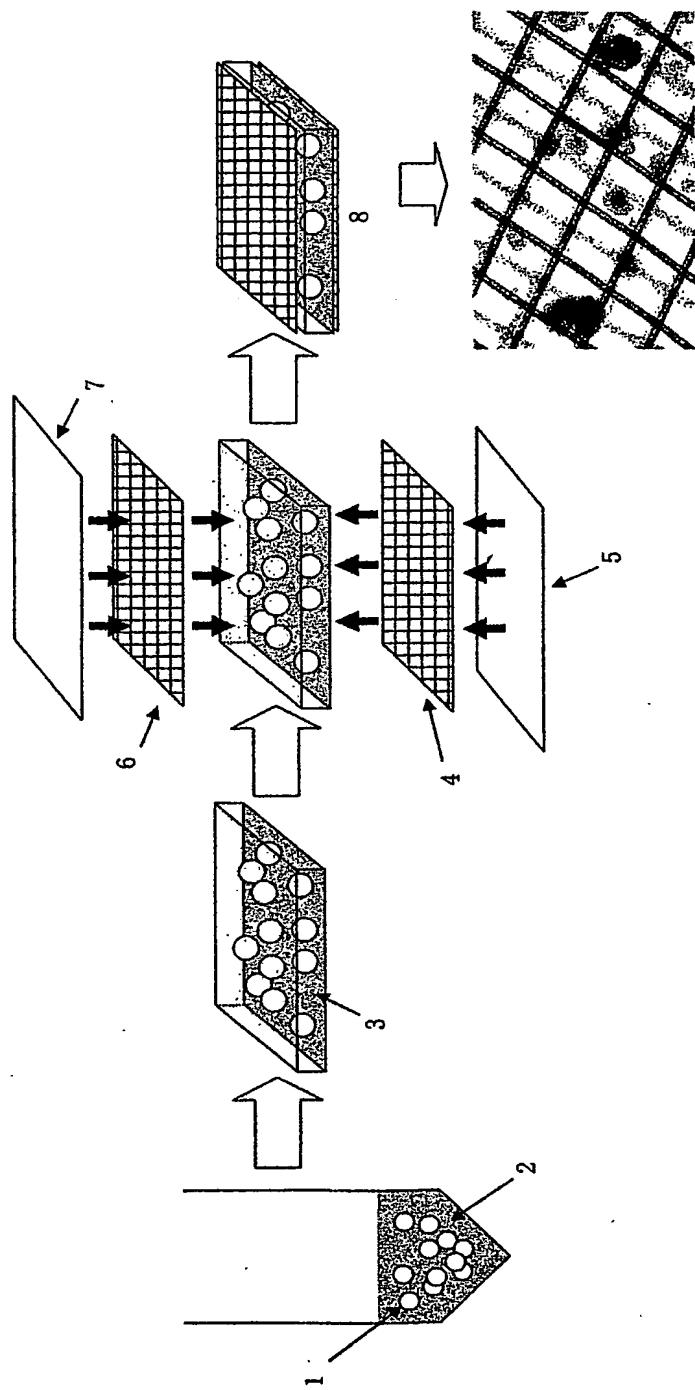
【図5】 製造例1又は比較例1に含有される臍島細胞を経時的に観察した顕微鏡写真を示す図である。

【符号の説明】

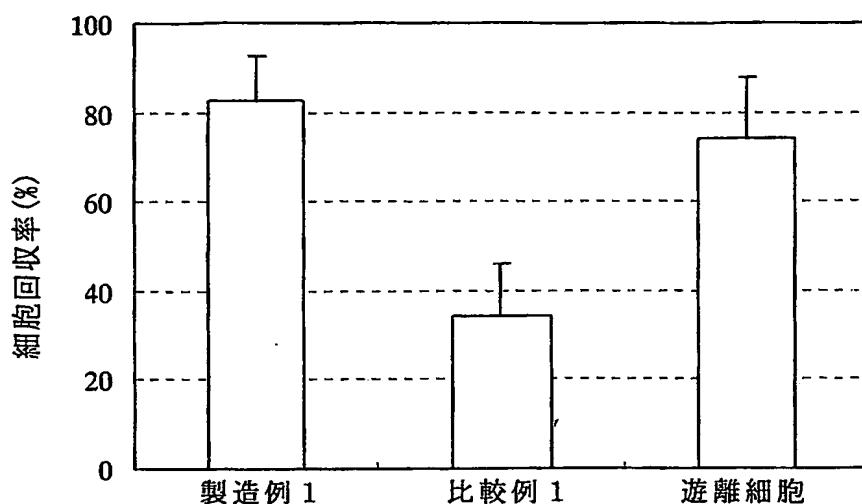
- 1 脍島細胞
- 2 PVA+EC溶液
- 3 PVA+ECゲル
- 4、6 メッシュシート
- 5、7 ガラスプレート
- 8 シート状臍島細胞含有製剤

【書類名】 図面

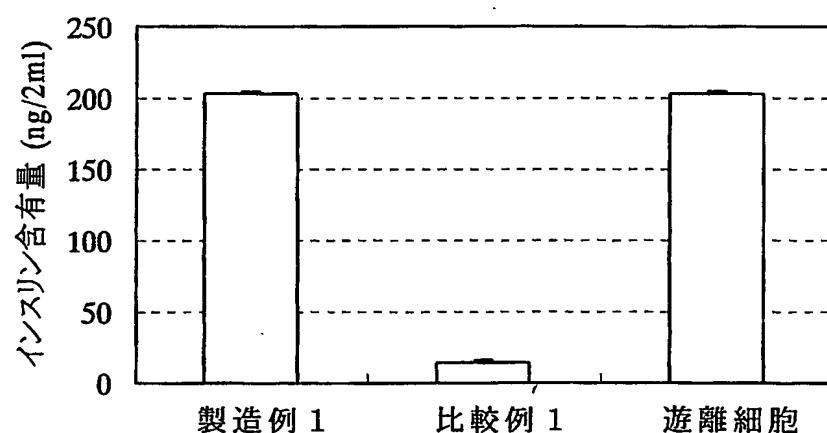
【図 1】



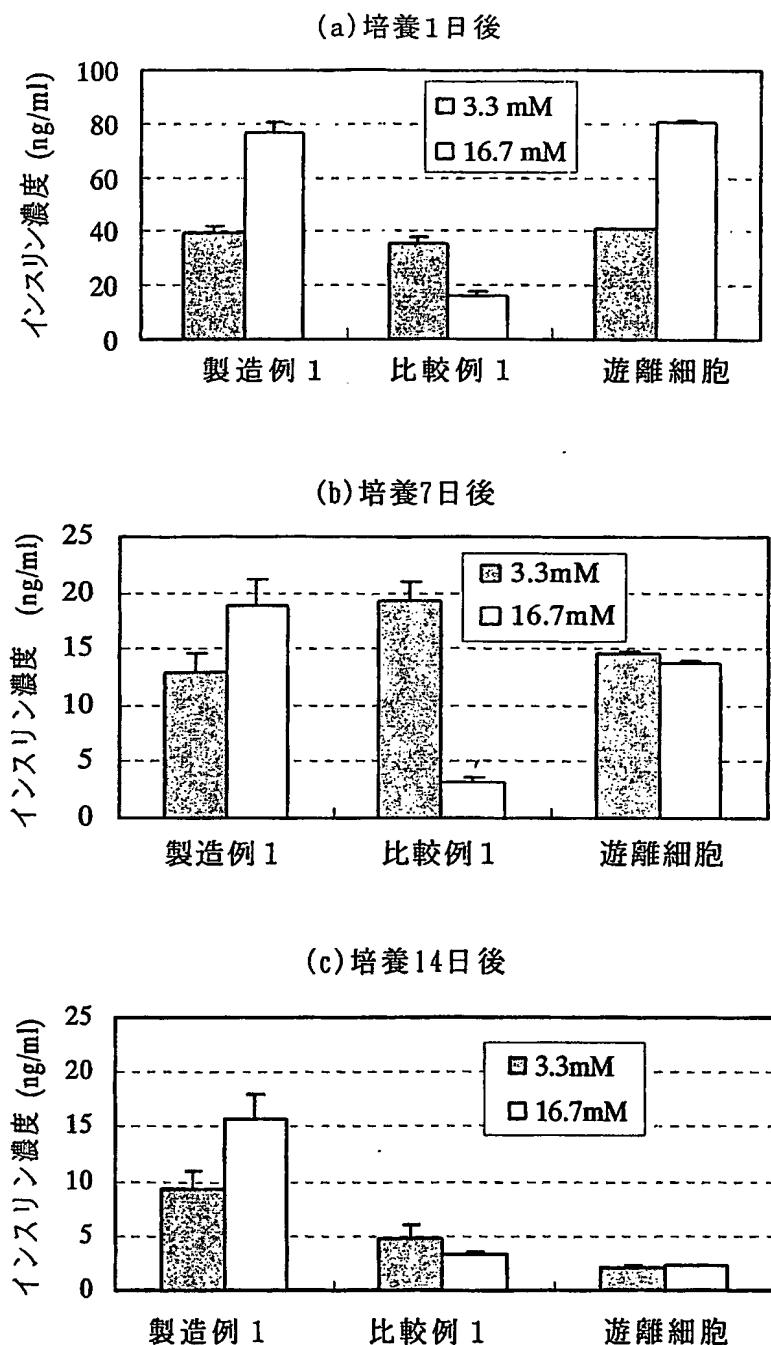
【図2】



【図3】

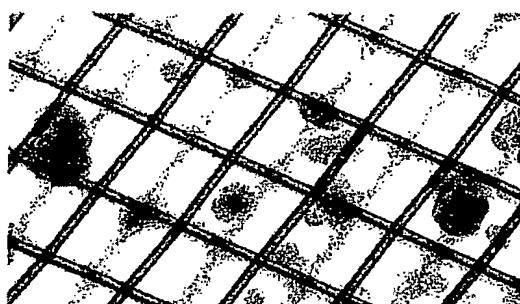


【図4】



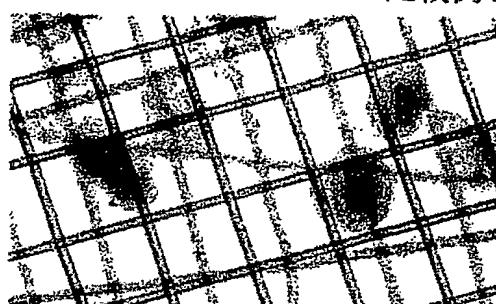
【図 5】

製造例 1

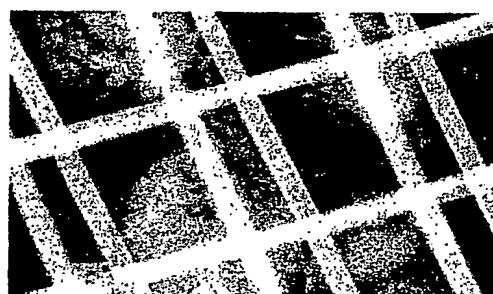


(a) 培養 1 日後

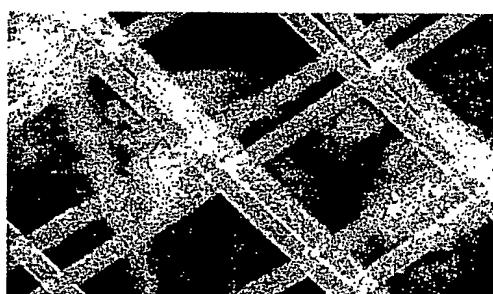
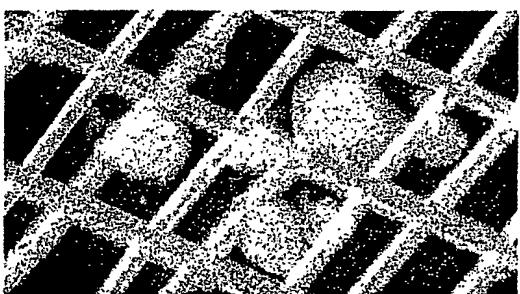
比較例 1



(b) 培養 7 日後



(c) 培養 14 日後



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、ポリビニルアルコール中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤並びに該細胞製剤の製造方法、及び該細胞製剤を患者に投与するによる内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 細胞保存剤が配合されたポリビニルアルコール中に、細胞を含有する細胞製剤。

【選択図】 なし

特願 2003-112103

出願人履歴情報

識別番号 [502068285]

1. 変更年月日 2002年 2月 25日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学再生医科学研
究所内
氏 名 井上 一知

特願 2003-112103

出願人履歴情報

識別番号 [502385517]

1. 変更年月日 2002年10月23日

[変更理由] 新規登録

住所 京都府京都市下京区東洞院通綾小路下る扇酒屋町302番地
氏名 株式会社クリエイティブ